

モノクローナル抗体の実験動物及びヒト腫瘍の診断・治療への応用

著者	菅原 邦夫
号	185
発行年	1989
URL	http://hdl.handle.net/10097/15785

氏 名（本籍）
菅 原 邦 夫

学 位 の 種 類
薬 学 博 士

学 位 記 番 号
薬 博 第 1 8 5 号

学位授与年月日
平成 2 年 3 月 2 8 日

学位授与の要件
学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程
東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 薬学専攻

学 位 論 文 題 目
モノクローナル抗体の実験動物及びヒト腫瘍の
診断・治療への応用

(主 査)
論文審査委員 教授 橋 本 嘉 幸 教授 南 原 利 夫
教授 大 内 和 雄

論文内容要旨

抗体産生細胞と骨髓腫細胞（ミエローマ）との融合細胞（ハイブリドーマ）から産生されるモノクローナル抗体（MoAb）はその特異性・均一性を武器に様々な分野で利用されている。医学・生物学の分野では特に腫瘍抗原に対するMoAbが注目され、様々な種類の癌細胞に対するMoAbが作成され、腫瘍抗原の解析に利用されるとともに、ヒト癌の診断・治療への応用も試みられている。

筆者らも本研究で実験動物及びヒト腫瘍の診断・治療へ応用可能なMoAbの作成及びその応用の可能性について検討した。まず、実験動物で発癌過程がよく研究されているN-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosoamine(BBN) 投与膀胱癌発生過程における腫瘍マーカーとしてチトクロームP-450（以下P-450と省略）に着目して、その発現を免疫組織化学的に検討した。次に、ヒト膀胱癌の尿診断へ応用可能なMoAbの作成を試み4種のMoAbを得た。これらMoAbの尿診断への応用性を検討するとともに、MoAbによって認識される抗原の生化学的性状を解析した。更に、ヒト上皮性癌、特に腺癌の診断・治療に有用と考えられるc-erbB-2産物を認識するMoAbを作成し、ヒト腺癌の診断・治療への応用の可能性を検討した。

1) BBN投与ラット膀胱癌発生過程における腫瘍マーカー

実験動物でその発癌過程がよく研究されているBBN投与ラット膀胱癌をモデルにその腫瘍マーカーを検討した。多環式芳香族炭化水素、芳香族アミン及びニトロサミンなどの化学発癌剤はそれ自身その化合物を代謝活性化するP-450アイソザイムを誘導することが肝臓を中心に腎臓及び肺等でも報告されている。BBN投与膀胱癌においてもP-450系酵素の代謝活性化への関与及びP-450アイソザイムの誘導が考えられ、P-450アイソザイムの変動が膀胱癌発生過程における腫瘍マーカーになる可能性がある。そこでP-450アイソザイムを認識するMoAbを用いて、BBN投与による膀胱癌発生過程における膀胱上皮のP-450アイソザイムの変動を免疫組織化学的に解析した。

MoAbは主にP-450dと反応するAPH-8とAPH-3、主にP-450cと反応するAPL-1とAPL-2及びP-450b、P-450eと反応するAPF-3を使用し、正常またはBBN投与ラットの膀胱及び各種組織の凍結切片を作成し、免疫組織染色を行った。膀胱以外の組織では正常ラットと比較し、BBN投与で抗ラットP-450 MoAbとの反応性に変化は認められなかった。未処理ラット膀胱上皮はいずれのMoAbとも反応しなかったが、BBN投与3週目から膀胱上皮にAPH-8によって染色される細胞群が観察され、以後膀胱上皮が移行上皮癌へと進行していくに従い、染色強度・染色される部位も増大していった。一方、他の4種のMoAbの反応性は発癌過程において変化しなかった。

APH-3の反応性に変化は認められなかったため、発癌過程において発現の認められたP-450アイソザイムをP-450dと断定することは出来ないが、APH-8によって認識されるP-450アイソザイムの発現がラット膀胱発癌における腫瘍マーカーになり得ることが示された。

2) ヒト膀胱癌尿診断へ応用可能なMoAbの作成及びその応用

α -fetoprotein(APF), carcinoembryonic antigen(CEA), CA19-9, CA125及びDU-PAN-2等の抗原の血中濃度とヒト癌の進行度との相関性がこれら抗原を認識するMoAbを用いて研究されており、血清診断の有用性も確認されている。膀胱癌ではその発生部位を考慮すると抗原は血中より尿中へ遊離しやすいと考えられるので、筆者らは膀胱癌の尿診断へ応用可能なMoAbの作成を試みた。

ラット培養系膀胱癌細胞あるいはヒト膀胱癌手術材料を免疫原にハイブリドーマを作成し、健常人尿と比較し膀胱癌患者尿と強く反応するMoAbを選別し、4種のMoAb; RBS-31, RBS-85, RBA-1及びHBP-1を得た。健常人及び各種疾患患者尿サンプルとMoAbとの反応性をEnzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)により検討した結果、4種のMoAbとも健常人尿との反応性は低いことが確認された。ここで、MoAbにより検出される健常人尿中抗原の unt の平均+4SDをcut off値とした場合、膀胱癌患者尿とはRBS-31が72%と最も高率に反応したほか、他の3種のMoAbも63%から35%の陽性率を示した。また、膀胱癌の術後でこれら尿中抗原は減少し、再発により再び増加する傾向も認められた。

次に、これらMoAbの認識する抗原の生化学的性状を検討した。RBS-31, RBS-85及びRBA-1は糖鎖を認識していることが明らかになり、更に、RBS-31はCDH(ceramide dihexoside)の糖鎖構造を、RBA-1は尿中の35-10kdの糖タンパク糖鎖を認識しているものと推定された。一方、HBP-1はタンパクを認識し、その分子量は尿中で80kd、膀胱癌組織で56kd及び100kd以上と同定された。

更に症例を重ねた検討が必要と考えられるが、これら4種MoAbが膀胱癌の尿診断へ応用可能であることが示された。

3) c-erbB-2産物に対するMoAbの作成及びその応用

癌原遺伝子c-erbB-2遺伝子はヒト細胞ゲノムからepidermal growth factor(EGF)-レセプター遺伝子に類似の遺伝子として見い出された。その遺伝子産物は185kdの膜通過型糖タンパクであり、細胞内領域にチロシンキナーゼを有していることも明らかになっている。この産物にEGF, TGF- α (いずれもEGF-レセプターと結合)、その他既知の増殖因子は結合しないことが確認されており、未知の増殖因子のレセプターと推定されている。c-erbB-2遺伝子の遺伝子増幅が種々

のヒト腫瘍で検索され、乳癌や胃癌などの腺癌で比較的高頻度に増幅が起こっていることが報告されている。更に、乳癌及び卵巣癌ではc-erbB-2遺伝子の遺伝子増幅のみられる症例では予後が悪いという報告もなされている。また、neu（ラットc-erbB-2）産物に対するMoAbが作成され、このMoAbが抗体単独でneu transfectantの増殖をin vitro及びin vivoで抑制することが報告されている。これらの事実に基づき、c-erbB-2産物を標的としたヒト腫瘍の診断・治療が期待されるので、ヒトc-erbB-2産物に対するMoAbの作成を試み、c-erbB-2産物の細胞外領域を認識するSV2-61 MoAbを得た。このSV2-61を用いて、ヒト培養系腫瘍細胞におけるc-erbB-2産物の発現及びSV2-61のin vitro及びin vivoでのc-erbB-2 transfectantの増殖に対する効果を検討した。

A. ヒトc-erbB-2産物に対するMoAbの作成

ヒトc-erbB-2遺伝子をマウスNIH3T3細胞に導入したtransfectantのSV11をBALB/cマウスに免疫し、その脾細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞融合し、抗体産生ハイブリドーマを得た。これら培養上清中の抗体活性を間接蛍光抗体法にて調べ、免疫原のSV11細胞と反応し、NIH3T3細胞と反応しないSV2-61 MoAbを得た。次に、SV2-61の種々のtransfectantとの反応性を間接蛍光抗体法を用い検討した。SV2-61はc-erbB-2遺伝子を導入したtransfectantとのみ反応し、活性型c-raf, EJ ras等c-erbB-2以外の遺伝子を導入したtransfectantとは反応しなかった。また、SV2-61はc-erbB-2遺伝子の細胞外領域の一部が欠損したタンパクをコードする遺伝子を導入したtransfectantとも反応しなかった。一方、SV2-61対応抗原の性状については、SV11細胞表面タンパクを ^{125}I 標識し、可溶化後、SV2-61を用いimmunoprecipitationすることにより、同抗体が報告されているc-erbB-2産物の分子量と一致する185kdのタンパクを認識することが判明した。また、SV2-61の免疫沈降物にin vitroで $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ を反応させることにより、185kdタンパクはリン酸化されたことより、SV2-61がキナーゼ活性及び自己リン酸化能を有するc-erbB-2産物と反応することも確実となった。

B. ヒト培養細胞におけるc-erbB-2産物の発現

種々のヒト培養系細胞におけるc-erbB-2産物の発現をEGF-レセプターの発現と比較しながら検討した。更に、これらタンパクの発現と遺伝子レベルでの調節との相関を明らかにする目的で、メッセンジャー(m)RNAの発現量と遺伝子増幅について検討した。

両タンパクの発現を約30種のヒト培養系細胞について、SV2-61とEGF-レセプターを認識する29-1MoAbを用い、間接蛍光抗体法で染色後、FACScanにより解析し、以下の知見を得た。1) 両タンパクともリンパ系腫瘍細胞では検出されなかった。2) c-erbB-2産物は検索した上皮性腫瘍細胞の全てに発現していた。3) c-erbB-2産物を過剰に発現していた細胞は消化器系癌細胞及び乳癌細胞であった。4) EGF-レセプターの発現は扁平上皮癌及び一部の腺癌に限局していた。5) 検索した細胞中、両タンパクともに過剰に発現していた細胞はなかった。

この様に、c-erbB-2産物とEGF-レセプターの発現様式が異なること、c-erbB-2産物は発現量に差は認められたが、検索した全ての上皮性腫瘍に発現が認められ、ヒト上皮性腫瘍全般の腫瘍マーカーになる可能性があることが示された。

タンパクレベルの発現を検討した癌細胞中、代表的な細胞9種について遺伝子レベルの解析をSouthern blot及びNorthern blotにより行った。c-erbB-2遺伝子の増幅が確認されたのはc-erbB-2産物を最も過剰に発現していたヒト胃癌細胞MKN-7だけであった。c-erbB-2 mRNAの発現量はタンパクの発現量と相関し、mRNAの過剰発現がタンパクの過剰発現につながっていた。すなわち、遺伝子増幅の認められない細胞でもmRNAの過剰発現に伴いc-erbB-2産物の細胞表面での発現量が増大することが確認された。

C. SV2-61のin vitro及びヌードマウスにおける抗腫瘍効果

ヌードマウス皮下にc-erbB-2あるいはc-raf transfectantを移植後、SV2-61を静脈内投与し、これら細胞の増殖に対するSV2-61の効果を検討した。SV2-61はc-raf transfectantの増殖には影響を与えなかったが、c-erbB-2 transfectantの増殖を顕著に抑制し、抗原特異的な抗腫瘍効果を示した。そこで、この抗腫瘍効果のメカニズムを検討した。まず、遠隔投与したSV2-61が実際に腫瘍に到達しているか調べるため、FITC標識SV2-61のin vivo投与による組織分布を検討した。その結果、全身的に投与したSV2-61は特異的にc-erbB-2 transfectantに到達・結合していることが示された。in vivo投与したMoAbの抗腫瘍効果は補体依存性細胞傷害性（CDC）や抗体依存細胞媒介細胞傷害性（ADCC）に起因するとの報告が多いので、SV2-61のCDC及びADCC活性を検討したが、両活性ともほとんど認められず、宿主免疫系の関与は少ないものと推定された。そこで、SV2-61がin vitroにおいて単独でc-erbB-2 transfectantの増殖に影響を及ぼすか否かについて検討した。その結果、SV2-61は抗体単独で抗原特異的にc-erbB-2 transfectantの軟寒天中でのコロニー形成を抑制することが確認された。また、SV2-61のin vivo投与により、ヌードマウス皮下に移植したc-erbB-2 transfectantの細胞表面よりc-erbB-2産物がdown regulateされること、in vitroのc-erbB-2 transfectantの培養液中にSV2-61を添加することによってもc-erbB-2産物がdown regulateされることが確認された。

この様に、SV2-61はc-erbB-2 transfectantの増殖をin vivo及びin vitro双方で抑制し、その増殖抑制効果には細胞表面でのc-erbB-2産物のdown regulationが関与しているものと推定された。

以上のごとく、今回作成したMoAbのヒト腫瘍の診断・治療における有用性が示された。

審 査 結 果 の 要 旨

モノクローナル抗体は各種の抗原分子の分離、精製、同定などに幅広く用いられると共に、各種の疾病の診断並びに治療への応用が計られている。菅原はモノクローナル抗体の腫瘍診断並びに治療を目的としてモノクローナル抗体を作成し、また、対応抗原分子の性状を及びその挙動を明らかにした。

1) 抗チロクローム P-450抗体を用いての膀胱発生過程における P-450アイソザイムの変動：ラットに N-butyl-N(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN) を経口投与し膀胱発生に至る40週間の各時期で膀胱組織を採取し、各 P-450アイソザイムの変動に対応するモノクローナル抗体を用いて観察した。その結果、P-450Hに選択性を持つ APH-8抗体により染色される細胞が BBN投与後3週目より出現し、以後、前がん変化に伴ってその細胞が著しく増加し、発生したがん細胞においても染色性が維持された。このような P-450アイソザイムの変化が BBNによる膀胱がん発生における BBNの活性化代謝に密接に関係していることが予測された。

2) ヒト膀胱がんの尿診断に応用可能なモノクローナル抗体の作成と応用：ヒト及び動物の膀胱癌を抗原としてモノクローナル抗体を作成し、膀胱がん患者尿中に増加する抗原と反応する抗体4種を選別し、これらの抗体を用いて尿診断法を確立すると共に対応抗原を同定した。抗体によりそれぞれパターンは異なるものの、いずれも膀胱がん患者尿では高値を示し、尿診断への有用性が示唆された。

3) ヒト c-erbB-2遺伝子産物の細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体の作成と応用：c-erbB-2は上皮細胞増殖因子受容体(EGF-R)の支配遺伝子である c-erbB-1と遺伝子構造が類似し、がん細胞増殖に係わる細胞表面たんぱくをコードすることが知られている。しかし、これまではその機能発現に重要な細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体は作成されていなかった。そこで、c-erbB-2遺伝子導入細胞を抗原とし、目的とするモノクローナル抗体数種を作成し、これらの抗体が c-erbB-2タンパクの細胞外ドメインを選択的に認識することを確認した。

さらに、これらのモノクローナル抗体は *in vivo* 及び *in vitro* において c-erbB-2タンパク陽性の腫瘍細胞の増殖を顕著に抑制すること、またその抑制作用は抗体結合による抗原(c-erbB-2タンパク)の細胞内への取り込み(down modulation)が原因であることが示された。

以上の研究はがんの診断・治療に有用なモノクローナル抗体を提供したと同時に、それらの抗体を用いての抗原解析並びに抗原機能の解明などにインパクトを与えるものであり、本論文は十分に博士論文に値するものと考えられる。